Rev. Écol. Biol. Sol, 1986, **23** (4) : 405-421.

Aptitude à la croissance de *Colpoda aspera* (Protozoaire Cilié) dans un sol humide préalablement stérilisé à l'oxyde de propylène, à l'autoclave et aux rayons gamma

PAR

L. PALKA et M. M. COÛTEAUX

C.N.R.S., U.A. 689, R.C.P. 675, M.N.H.N., Laboratoire d'Écologie Générale, 4, av. du Petit-Château, 91800 Brunoy (France)

Synopsis: The growth of *Colpoda aspera* (Protozoa Ciliophora) in humus previously fumigated by propylene oxide, autoclaving or gamma-irradiated has been studied. These experiments show that sterilization by propylene oxide appears to be the most appropriate for studying the kinetics of bacteriophagous ciliates in organic soil. The results may influence hypotheses regarding interaction of prey and predator densities.

Keywords: *Colpoda aspera* (Protozoa Ciliophora) - Humus - Sterilization - Bacteria - Populations dynamics.

INTRODUCTION

La fumigation à l'oxyde de propylène, l'autoclavage et les rayons gamma constituent les principales méthodes de stérilisation du sol utilisées par les protistologues écologistes. Ces méthodes ne parviennent pas à une stérilisation totale du sol (STOTZY et MORTENSEN, 1959 ; HOWARD et FRANCKLAND, 1974 ; KHAFIF *et al.*, 1983), mais permettent une réduction efficace du nombre de germes (ENO et POPENOE, 1964 ; SKIPPER et WESTERMANN, 1973). Seuls MCLAREN *et al.* (1957) semblent parvenir à une stérilisation totale après irradiation. Ces méthodes de stérilisation s'accompagnent également de modifications physico-

Reçu le 13-6-86.
Accepté le 10-11-86.

chimiques dont la nature et l'amplitude varient suivant les traitements, la nature et l'humidité du sol, et conditionnent la croissance des microorganismes inoculés.

Dans un sol fumigé à l'oxyde de propylène, les modifications chimiques se manifestent par une augmentation significative du pH (SKIPPER et WESTERMANN, 1973), une accumulation de résidus carbonés et une libération d'ammonium (ALDRICH et MARTIN, 1952 ; SKIPPER et WESTERMANN, 1973). Par contre, dans un sol autoclavé ou irradié, elles s'avèrent beaucoup plus importantes et proportionnelles à la teneur en matière organique. L'autoclavage entraîne une diminution du pH (SKIPPER et WESTERMANN, 1973) et provoque de même que les rayons gamma une libération d'ammonium échangeable (ENO et POPENOE, 1964 ; BOWEN et CAWSE, 1964 a ; COLEMAN et MCFADYEN, 1966 ; SALONIUS *et al.*, 1967) et une solubilisation de la matière organique, des carbohydrates et de cations divers (SALONIUS *et al.*, 1967 ; HOWARD et FRANKLAND, 1974 ; POWLSON et JENKINSON, 1976). Dans un sol autoclavé, la production de CO_2 est nulle (RAMSAY et BAWDEN, 1983). Par contre, un sol irradié présente une forte respiration (PETERSON, 1962 ; BOWEN et CAWSE, 1964 a ; ROBERGE, 1971) résultant de l'activité de certaines enzymes résistantes comme les uréases (BOWEN et CAWSE, 1964 a). Selon MCLAREN *et al.* (1957), la production d'ammonium à partir d'urée serait nulle dans un sol autoclavé, et encore effective dans un sol irradié par des doses d'irradiation supérieures à 15 Mrad.

Les altérations physiques liées à l'oxyde de propylène ne sont pas clairement établies. Toutefois, VAN BAVEL (1950) montre qu'une substance chimique similaire telle que l'oxyde d'éthylène peut dans certains cas entraîner une agrégation du sol qui disparaît en présence de microorganismes inoculés. Dans un sol autoclavé, l'agrégation augmente en liaison avec une diminution de la capacité de rétention d'eau (MARTIN et ALDRICH, 1952). Par contre, un sol irradié par les rayons gamma présente une capacité de rétention d'eau accrue, une diminution de la percolation et de la stabilité des agrégats (BOWEN et GAWSE, 1966 a ; SALONIUS *et al.*, 1967).

La capacité du sol à être recolonisé par les bactéries varie selon la méthode de stérilisation. Dans un sol fumigé à l'oxyde de propylène, la croissance bactérienne est stimulée par des résidus carbonés de propylèneglycol (ANDERSON *et al.*, 1978). En revanche, dans un sol autoclavé elle est temporairement inhibée, le temps de latence variant selon l'espèce (KARTZNELSON, 1940 ; PETERSON, 1962 b ; TU, 1982). Dans un sol irradié, l'inhibition n'est pas toujours observée (PETERSON, 1962 b ; SALONIUS *et al.*, 1967).

L'aptitude des protozoaires à recoloniser un sol stérilisé, n'a pas fait l'objet jusqu'à présent, d'études approfondies, mise à part STOUT (1955 a) qui n'a pratiqué qu'une stérilisation partielle. Pourtant la stérilisation du sol est fréquemment utilisée. ANDERSON *et al.* (1978) ainsi que WOODS *et al.* (1981) utilisent la fumigation à l'oxyde de propylène, HABTE et ALEXANDER (1975) et récemment FREY *et al.* (1985) l'autoclavage, DARBYSHIRE (1976) les rayons gamma. C'est pourquoi, le travail présenté ici se propose de déterminer une méthode de stérilisation du sol favorable à la croissance de *C. aspera*. Il a pour but également d'apporter des données supplémentaires sur les relations protozoaires-bactéries du sol.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A) Nature et origine du sol.

L'humus utilisé provient d'un néopodzol à tendance dysmoder de la forêt de Fontainebleau (Station Biologique de Foljuif, France). Il correspond aux couches F (fermentation) et H (humification). Pour plus de précision sur les caractéristiques pédologiques de ce sol, on se référera à GARAY (1980). L'échantillonnage a été réalisé au cours du mois de novembre 1984. L'humus a été tamisé à 2 mm puis stocké 12 mois à l'abri de l'évaporation.

B) Microcosmes.

L'humus frais a été conditionné à raison d'une quantité correspondant à 1,5 g d'humus sec dans des seringues selon un dispositif mis au point par COÛTEAUX (1984) et utilisé dans deux expériences antérieures (COÛTEAUX, 1985 a et b). Ces seringues sont équipées d'un diaphragme à joint torique fermé par une soie à bluter permettant de maintenir la densité apparente à 0,25, c'est-à-dire à un niveau comparable à celui du sol en place tout en respectant l'aération du système. La teneur en eau a été ajustée après la stérilisation à 300 % du poids sec (séché à l'étuve à 105° C pendant 24 heures) ce qui correspond à pF1 (COÛTEAUX, 1985). Les microcosmes ont été incubés dans une chambre à température constante (20° C).

A ce taux d'humidité (ALABOUVETTE *et al.*, 1981), les pores dont le diamètre est inférieur à 300 µm sont remplis d'eau. La taille de *C. aspera* étant comprise entre 20 et 40 µm (FOISSNER, 1980), on peut supposer que l'espace disponible pour le cilié se situe dans les pores compris entre 30 et 300 µm, correspondant à une humidité actuelle comprise entre pF2 (126 %) et pF1 (300 %).

C) Stérilisations.

Toutes les stérilisations ont été réalisées sur l'humus frais.

— *Oxyde de propylène :*

Une aliquote d'humus (150 g) a été fumigée 48 heures, sous vide afin d'améliorer la pénétration des vapeurs. L'humus a été ensuite aéré durant 48 heures en conditions stériles, pour éliminer les vapeurs, puis réparti dans les seringues. Cette opération a été réalisée dans le laboratoire de Recherches sur la faune du sol de l'I.N.R.A. de Dijon (France).

— *Autoclave :*

L'humus conditionné en microcosmes a été autoclavé deux fois durant 20 mn à 120° C, avec une période intermédiaire d'incubation de 24 heures à température ambiante. Cette opération a été réalisée à Brunoy (France) dans le laboratoire du Muséum National d'Histoire Naturelle.

— *Rayons gamma :*

L'humus, conditionné en microcosmes groupés par 3 dans des sacs plastics soudés, a été irradié à 5 Mrad (DARBYSHIRE, 1976), par la société « Conservatom » à Lyon (France).

Dans les trois cas, les orifices de chaque seringue ont été bouchés avec du coton hydrofuge stérile recouvert de parafilm, de façon à éviter toute contamination et limiter l'évaporation.

Des tests de stérilité ont été réalisés par étalement de 0,1 ml d'une suspension de sol dilué au 1/10 sur du milieu d'extrait de sol gélosé (POCHON et TARDIEUX, 1962) à partir de 6 microcosmes par mode de stérilisation. Pour l'autoclave, ils ont pu être effectués

immédiatement. Ils l'ont été après deux jours pour la fumigation à l'oxyde de propylène et 6 mois après l'irradiation en raison de contraintes techniques.

D) **Mesure du pH.**

Les mesures de pH ont été réalisées dans de l'eau déminéralisée, avec 3 répétitions par mesure.

E) **Les souches inoculées.**

La souche bactérienne ammonifiante AL 83 a été isolée par G. Faurie dans le laboratoire de Biologie des sols de Lyon I à partir d'un sol argilo-limoneux de pH 6,24. Elle est constituée de bacilles gram négatifs. Elle a été entretenue sur du milieu pour ammonifiant comprenant pour 1.000 ml : 50 ml de solution mère saline de Winogradsky (Pochon et Tardieux, 1962), 0,5 g d'asparagine et 0,1 g d'extrait de levure.

Les bactéries totales de l'humus ont été séparées des autres organismes par filtration sur Millipore à 2 µm (Millipore Filter Corporation, Bedford, Massachussetts 01730). En effet, Frey *et al.* (1985) montrent qu'une filtration à 3 µm retient 100 % des amibes et des ciliés et 95 % des flagellés.

C. aspera a été isolé à partir de l'humus échantillonné. Cette espèce a été déterminée en suivant la classification de Kahl (1930-1935 d'après Foissner, 1980) à partir d'individus fixés et imprégnés au protéinate d'argent selon la méthode de Bodian modifiée par Grolière (1980).

C. aspera a été cultivée à partir d'individus sauvages, d'abord sur *Aerobacter aerogenes* puis de façon monoxénique sur AL 83.

a) Cultures clonales sur *A. aerogenes* en milieu de laitue :

Le milieu de laitue est obtenu en portant à ébullition pendant 10 mn une suspension contenant 1,5 g de poudre de laitue + 1.000 ml d'eau déminéralisée. L'infusion est ensuite refroidie et filtrée (le pH ajusté à 6,8 avec du CaCO3) puis autoclavée.

Un individu a été isolé d'un groupe de trophozoïtes lavés plusieurs fois dans des bains d'eau minérale naturelle de Volvic pour être cultivé sur *A. aerogenes.*

b) Cultures clonales monoxéniques sur AL 83 en milieu pour ammonifiant :

Les cultures monoxéniques ont été mises en place à partir de spécimens provenant des cultures sur *A. aerogenes.* Les ciliés ont été débarassés de *A. aerogenes* en utilisant la méthode de Darbyshire (1972) quelque peu modifiée. Cette méthode consiste à transférer des ciliés (trophozoïtes ou kystes) dans 10 bains constitués d'un mélange d'antibiotiques : 0,1 g de sulfate de streptomycine, 0,2 g de sulfate de néomycine et 1,4 g d'ampicilline, dans le cas présent pour 1.000 ml de solution minérale stérile de Winogradsky (Pochon et Tardieux, 1962). Cette désinfection a été réalisée sur les trophozoïtes, les kystes étant plus difficilement manipulables. La modification apportée à cette méthode réside dans l'allongement de la durée du premier bain à une nuit. Les individus résistants ont été ensuite lavés rapidement dans les bains suivants, puis dans de l'eau de Volvic stérile pour être finalement cultivés en milieu pour ammonifiant sur AL 83. La composition bactérienne des cultures a été vérifiée après plusieurs jours et n'a révélé aucune contamination.

F) **Dénombrements.**

a) Bactéries

Les estimations ont été obtenues par la méthode des suspensions-dilutions (Pochon et Tardieux, 1962) après sonication d'une minute dans une cuve à ultra-sons (Schwartz, 1981) afin de libérer les bactéries retenues dans les agrégats. Les numérations ont été

réalisées en boîtes de Pétri, avec 3 répétitions par niveau de dilution. Les bactéries AL 83 ont été dénombrées sur milieu pour ammonifiant gélosé après 2 jours d'incubation à température ambiante, les bactéries totales sur extrait de sol gélosé (POCHON et TARDIEUX, 1962) après 7 jours d'incubation à température ambiante.

b) *C. aspera*

Le comptage direct en cuve de Dolfuss a été utilisé pour estimer les densités de trophozoïtes cultivés en milieu liquide et inoculés dans les microcosmes. Une aliquote additionnée de lugol est répartie dans les concavités d'une cuve de Dolfuss et les ciliés sont dénombrés sous une loupe binoculaire.

La méthode des doubles dilutions de BUITKAMP (1979) a été utilisée pour dénombrer les trophozoïtes et les kystes dans l'humus. Elle a été modifiée dans le sens où elle a été appliquée au sol frais (COÛTEAUX, 1985). Huit niveaux de dilution ont été réalisés avec huit répétitions. L'estimation des densités a été obtenue par la méthode du nombre le plus probable (FISHER et YATES, 1943). Dans la plupart des cas, une aliquote de 500 µl a été utilisée pour effectuer les doubles dilutions. Dans les quelques cas où l'observation immédiate des plus fortes dilutions a montré une présence de trophozoïtes, une aliquote de 50 µl a été utilisée.

Pour le dénombrement des kystes, les dilutions ont été enrichies en bactéries (AL 83 ou bactéries totales) et incubées 3 jours à température ambiante. Les densités maximales de kystes estimables par cette méthode sont de l'ordre de 5.500 pour une aliquote de 500 µl et 40.000 pour 50 µl. Les valeurs proches des limites de la méthode ont été symbolisées sur les courbes par une flèche vers le haut.

G) **Protocole expérimental.**

— Expérience A : *C. aspera* + AL 83.

Vingt sept microcosmes ont été mis en place : 9 stérilisés à l'oxyde de propylène, 9 autoclavés et 9 irradiés.

a) Inoculation des bactéries.

Un ml d'une suspension d'AL 83, correspondant à une densité de l'ordre de 10^8 germes, a été inoculée au cœur des microcosmes à l'aide de seringues stériles.

b) Inoculation de *C. aspera.*

Un ml d'une culture de *C. aspera*, contenant 4.000 trophozoïtes, a été inoculé à l'aide de seringues stériles 7 jours après les bactéries, de façon à permettre une bonne colonisation du milieu par celles-ci. A supposer que cette inoculation n'ait pas induit une mortalité de stress, la densité de trophozoïtes au moment de l'inoculation devrait être de 2.700 g^{-1} s. s.

c) Rythme des mesures.

Les numérations d'AL 83 et de *C. aspera* ont été faites après 3, 7 et 14 jours, avec pour chacune 3 répétitions. D'après les résultats de DARBYSHIRE (1972), trois numérations en 14 jours nous ont paru suffisantes pour tester la croissance de *C. aspera.*

— Expérience B : *C. aspera* + bactéries totales.

Quarante-cinq microcosmes ont été mis en place (15 stérilisés à l'oxyde de propylène, 15 autoclavés et 15 irradiés).

a) Inoculation des bactéries totales.

Un ml d'une suspension de sol filtrée à 2 µm contenant 4×16^6 bactéries a été inoculé dans chaque microcosme à l'aide de seringues stériles.

b) Inoculation de *C. aspera.*

Initialement, cette expérience avait pour but d'étudier la croissance des populations de bactéries ainsi que celles des protozoaires totaux et des ciliés dans l'humus stérilisé

après l'ajout d'une aliquote de sol frais. Une inoculation accidentelle de *C. aspera*, probablement due à la présence de kystes sur la grille du système millipore au moment de la filtration de la microflore totale (cf. 5), nous a amené à modifier notre protocole et à suivre les cinétiques de populations de *C. aspera* en présence de la microflore totale. Nous avons choisi de poursuivre cette expérience de façon à mettre en évidence l'impact de l'humus stérilisé sur la croissance des populations de bactéries de la microflore totale, mais également en raison de l'intérêt que présente l'étude comparative du devenir de *C. aspera* en présence d'un ou de plusieurs types de bactéries.

c) Rythme des mesures.

L'inoculation accidentelle des ciliés a été mise en évidence plusieurs jours après l'inoculation de la suspension de sol. Les numérations des bactéries et des ciliés (trophozoïtes et kystes) ont donc été réalisées plus tardivement que dans l'expérience A, après 10, 14, 21, 28 et 35 jours de culture. Les densités correspondent à deux répétitions.

II. — RÉSULTATS ET INTERPRÉTATION

A) Mesures du pH.

Le pH de l'humus non traité est de 4,7 ± 0,13. Une alcalinisation significative a été constatée dans l'humus fumigé (5,25 ± 0,10), de même qu'une légère acidification dans l'humus autoclavé (3,92 ± 0,02). Cette évolution du pH confirme les résultats de Skipper et Westermann (1973). Dans l'humus irradié, le pH n'a pas été modifié (4,31 ± 0,14).

B) Tests de stérilité.

Dans le cas de l'humus fumigé, 4 microcosmes se sont révélés stériles et 2 contaminés par des densités bactériennes ne dépassant pas 10^3 bactéries g^{-1} s.s.

Dans l'humus autoclavé, aucun développement fongique ou bactérien n'a été constaté.

Par contre, dans l'humus irradié, les tests ont révélé une contamination bactérienne et fongique, germes qui ne se sont pas développés sur le milieu pour ammonifiant.

C) Stérilisations.

Une certaine variabilité des densités de ciliés suivant les répétitions nous a amené à utiliser les valeurs moyennes pour l'élaboration des courbes (Fig. 1 à 6) et à nous référer aux données brutes pour leur interprétation (Tab. I à VI).

Les intervalles de confiance à 95 % des densités de bactéries mentionnés sur les courbes ont été calculés à partir de la variance. Les intervalles de confiance à 95 % des densités de ciliés mentionnés dans les tableaux ont été calculés selon la méthode du nombre le plus probable (Fisher et Yates, 1943).

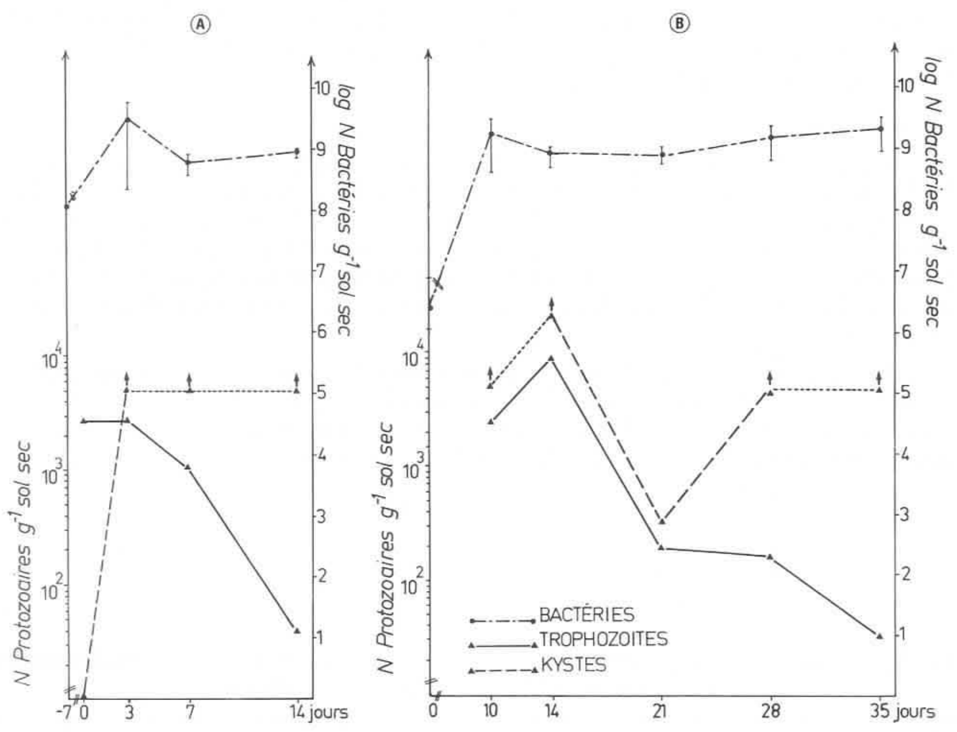


FIG. 1. — Cinétiques de croissance des Protozoaires Ciliés et des bactéries dans l'humus fumigé à l'oxyde de propylène : *C. aspera* + AL 83 (A) ; *C. aspera* + bactéries totales (B).

1. *Stérilisation à l'oxyde de propylène :*

— Expérience A (Fig. 1 A et Tab. I).

Les populations de bactéries AL 83 sont stationnaires avec des densités de l'ordre de 10^8 g^{-1} s.s. tandis que celles des trophozoïtes stagnent puis décrois-

TAB. I

Densités de *C. aspera* (trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence d'AL 83 dans l'humus stérilisé à l'oxyde de propylène

	Microcosmes	jour 3	jour 7	jour 14
trophozoïtes	1	4.274 (1.902-6.895)	1.214 (710-2.448)	281 (172-447)
	2	2.340 (1.160-4.875)	1.376 (775-2.961)	443 (269-777)
	3	1.718 (945-4.100)	594 (357-1.068)	165 (101-261)
kystes	1	> 5.500	> 5.500	> 5.500
	2	> 5.500	> 5.500	> 5.500
	3	> 5.500	> 5.500	> 5.500

sent. Ces dernières varient entre 1.700 et 4.300 g^{-1} s.s. au jour 3 et sont inférieures à 500 au jour 14. Les densités de kystes correspondantes sont toujours supérieures à 5.500 g^{-1} s.s.

— Expérience B (Fig. 1 B et Tab. II).

Les densités de bactéries de la microflore totale atteignent $1,66 \times 10^9 \pm 1,25 \times 10^9$ g^{-1} s.s. au jour 10 puis restent stable. La croissance des populations de trophozoïtes est maximale entre les jours 10 et 14 puis diminue. La variabilité des densités de ciliés est la plus forte au jour 14 avec près de 18.000 trophozoïtes g^{-1} s.s. dans un microcosme contre 900 dans le second. En revanche, au jour 28, les densités minimales sont inférieures à 50 g^{-1} s.s. dans les deux répétitions.

En conclusion, dans l'humus fumigé à l'oxyde de propylène, la stimulation de la croissance bactérienne assure une activité précoce mais temporaire des ciliés. Dans l'humus inoculé avec la microflore totale, l'optimum de croissance des populations de ciliés est plus tardif en raison des conditions d'inoculation de *C. aspera.*

TAB. II

Densités de *C. aspera* (trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence des bactéries totales dans l'humus stérilisé à l'oxyde de propylène

	Microcosmes	jour 10	jour 14	jour 21	jour 28	jour 35
trophozoïtes	1	3.087 (1.435-5.798)	906 (521-1.648)	275 (164-459)	71 (44-116)	45 (26-74)
	2	1.718 (945-4.100)	18.242 (9.449-40.998)	133 (81-210)	275 (164-459)	23 (10-39)
kystes	1	> 5.500	> 5.500	377 (220-700)	> 5.500	> 5.500
	2	> 5.500	37.181 (20.063-48.412)	306 (182-553)	> 5.500	> 5.500

TAB. III

Densité de *C. aspera* (trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence d'AL 83 dans l'humus stérilisé à l'autoclave

	Microcosmes	jour 3	jour 7	jour 14
trophozoïtes	1	22 (6-39)	328 (200-521)	9.683 (6.766-14.478)
	2	10 (9-25)	192 (118-310)	8.658 (5.910-13.274)
	3	10 (8-14)	253 (153-402)	448 (293-656)
kystes	1	> 5.500	> 5.500	> 5.500
	2	2.125 (1.137-4.776)	> 5.500	> 5.500
	3	1.835 (1.009-4.380)	> 5.500	> 5.500

2. *Stérilisation à l'autoclave :*

— Expérience A (Fig. 2 A et Tab. III).

Les densités de bactéries AL 83, de l'ordre de 10^8 g^{-1} s.s. au moment de l'inoculation, décroissent temporairement jusqu'à des densités inférieures à 10^5 g^{-1} s.s. dans tous les microcosmes au jour 3. Parallèlement, après l'inoculation de *C. aspera* (2.700 g^{-1} s.s), les populations de trophozoïtes décroissent et deviennent négligeables au jour 3. Elles augmentent avec la reprise de croissance bactérienne, les densités maximales variant entre 450 et 9.700 trophozoïtes g^{-1} s.s. au jour 14. Le nombre de kystes, supérieur à l'inoculum dès le jour 3 dans un microcosme, augmente parallèlement aux densités de trophozoïtes et devient supérieur à 5.500 g^{-1} s.s. dans tous les microcosmes au jour 7.

— Expérience B (Fig. 2 B et Tab. IV).

Les densités des bactéries de la microflore totale (4×10^6 g^{-1} s.s. au moment de l'inoculation) décroissent temporairement et deviennent inférieures à 10^5 g^{-1} s.s. aux jours 10 et 14 dans tous les microcosmes. Le temps de latence est plus long que celui des bactéries AL 83. Parallèlement, la croissance des populations de ciliés est nulle puis reste négligeable malgré la reprise de la crois-

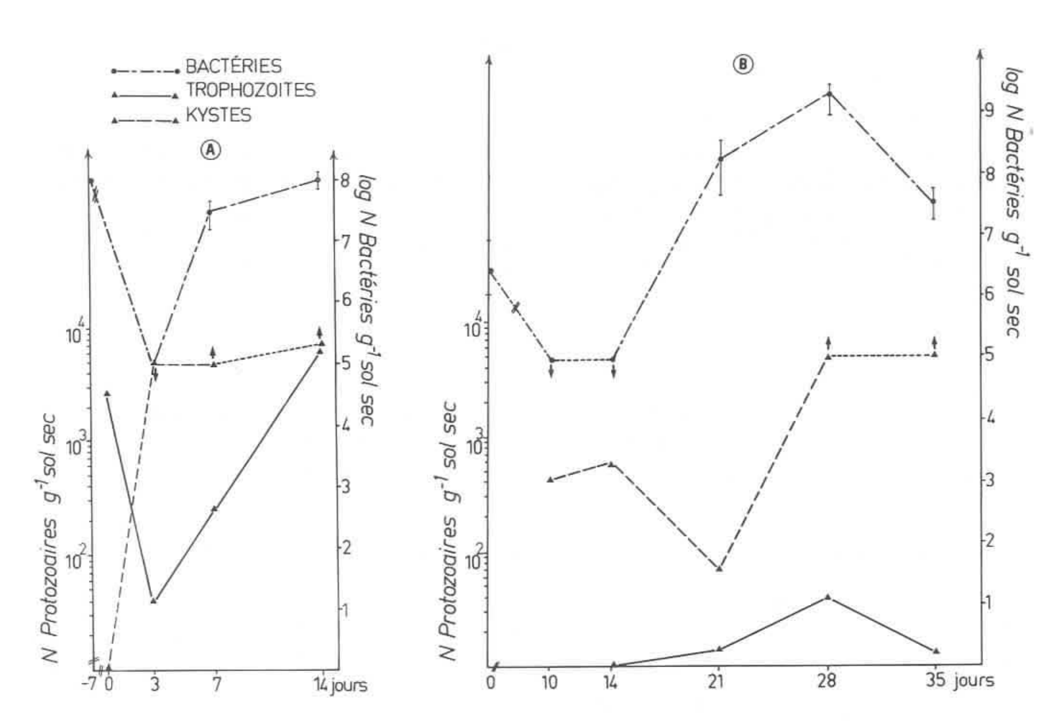


FIG. 2. — Cinétiques de croissance des Protozoaires Ciliés et des bactéries dans l'humus autoclavé : *C. aspera* + AL 83 (A) ; *C. aspera* + bactéries totales (B).

TAB. IV

Densités de *C. aspera* (trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence des bactéries totales dans l'humus stérilisé à l'autoclave

	Microcosmes	jour 10	jour 14	jour 21	jour 28	jour 35
tropho-zoïtes	1	0	0	14 (6-22)	49 (28-82)	16 (15-35)
	2	0	0	14 (6-22)	33 (15-56)	11 (5-28)
kystes	1	94 (56-154)	945 (645-1.449)	65 (41-107)	> 5.500	> 5.500
	2	755 (552-1.180)	247 (177-402)	52 (32-85)	> 5.500	> 5.500

sance bactérienne. Les densités de kystes deviennent toutefois supérieures à 5.500 g^{-1} s.s. dans tous les microcosmes. La chute brutale des densités de bactéries au jour 28 est inexpliquée.

En conclusion, dans l'humus autoclavé, l'inhibition temporaire d'AL 83 induit une croissance tardive des populations de ciliés. Par contre, malgré la reprise de croissance des bactéries de la microflore totale, les ciliés restent inhibés.

3. *Stérilisation aux rayons gamma :*

— Expérience A (Fig. 3 A et Tab. V).

Les densités de bactéries AL 83, de l'ordre de 10^8 g^{-1} s.s. au moment de l'inoculation, diminuent temporairement en dessous de 10^5 g^{-1} s.s. au jour 3 dans tous les microcosmes. Après l'inoculation de *C. aspera* (2.700 g^{-1} s.s.), les densités de trophozoïtes décroissent jusqu'à n'être plus détectables au jour 3 puis augmentent parallèlement à la croissance bactérienne. Elles deviennent

TAB. V

Densités de *C. aspera* trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence d'AL 83 dans l'humus stérilisé aux rayons gamma

	Microcosmes	jour 3	jour 7	jour 14
trophozoïtes	1	0	106 (64-167)	6.478 (3.888-11.645)
	2	0	46 (30-68)	281 (172-447)
	3	0	52 (33-78)	1.824 (945-4.100)
kystes	1	648 (389-1.164)	> 5.500	> 5.500
	2	810 (478-1.440)	> 5.500	> 5.500
	3	500 (294-848)	> 5.500	> 5.500

maximales au jour 14, variant entre 280 et 6.500 g^{-1} s.s. Les densités de kystes sont inférieures à 1.000 g^{-1} s.s. au jour 3 puis restent supérieures à 5.500.

— Expérience B (Fig. 3 B et Tab. VI).

Les populations des bactéries de la microflore totale atteignent $5{,}4 \times 10^8 \pm 1{,}5 \times 10^8$ g^{-1} s.s. au jour 10. Les densités de trophozoïtes sont toujours relativement faibles, mise à part au jour 21 où elles atteignent 2.400 g^{-1} s.s. dans un microcosme. Par la suite, elles diminuent, coïncidént avec une reprise de croissance des populations bactériennes.

TAB. VI

Densités de *C. aspera* (trophozoïtes et kystes par g s. s.) en présence des bactéries totales dans l'humus stérilisé aux rayons gamma

	Microcosmes	jour 10	jour 14	jour 21	jour 28	jour 35
trophozoïtes	1	0	180 (100-287)	2.367 (150-3.902)	9 (4-24)	46 (26-78)
	2	0	13 (8-16)	16 (5-32)	16 (5-32)	32 (10-44)
kystes	1	38 (21-65)	57 (34-103)	17.526 (10.492-40.806)	> 5.500	> 5.500
	2	165 (101-266)	49 (28-35)	727 (414-1.321)	> 5.500	1.544 (1.435-3.185)

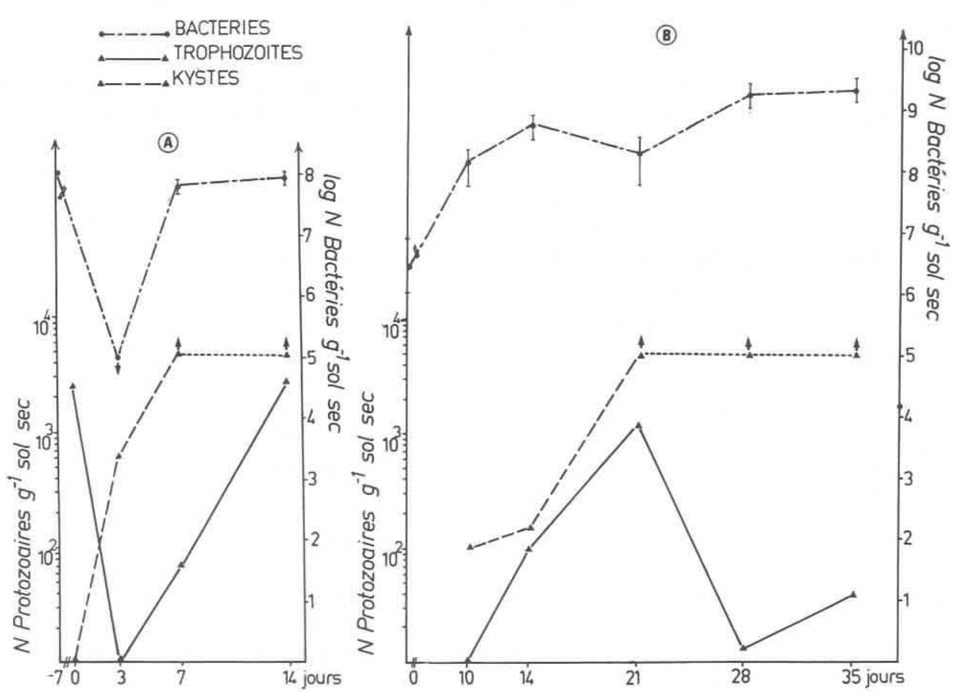


FIG. 3. — Cinétiques de croissance des Protozoaires Ciliés et des bactéries dans l'humus irradié : *C. aspera* + AL 83 (A) ; *C. aspera* + bactéries totales (B).

En conclusion, dans l'humus irradié, l'inhibition temporaire d'AL 83 induit une croissance tardive des populations de ciliés. En présence de la microflore totale, malgré le développement rapide des populations bactériennes, la croissance des populations de ciliés est tardive également et temporaire.

III. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

A) Choix de la méthode de stérilisation.

Outre l'enrichissement nutritionnel apporté par les cadavres, valable quelle que soit la méthode de stérilisation, l'oxyde de propylène entraîne une accumulation de propylèneglycol (ANDERSON *et al.*, 1978) qui constitue une source carbonée pour les bactéries. Ces potentialités énergétiques supplémentaires stimulent la croissance des populations bactériennes et créent ainsi des conditions trophiques qui sollicitent le caractère opportuniste de *C. aspera* décrit comme un stratège —r typique par LÜFTENEGGER *et al.* (1985) et permettent une réponse rapide de ce prédateur. La fumigation de l'humus forestier à l'oxyde de propylène crée donc une situation optimisante pour accentuer, dans un court laps de temps, les effets des relations inter-organismes.

Par contre, l'autoclave et les rayons gamma créent des conditions néfastes à une recolonisation rapide des ciliés. Dans l'humus autoclavé, la forte solubilisation de la matière organique et des carbohydrates (ENO et POPENOE, 1964 ; SALONIUS *et al.*, 1964), paradoxalement, ne stimule pas la croissance bactérienne. Au contraire, la croissance bactérienne est inhibée temporairement (KATZNELSON, 1940 ; PETERSON, 1962 b) et induit une croissance tardive de *C. aspera*. On peut donc supposer que l'inhibition résulte de substances toxiques néoformées, peut-être des polyphénols libérés par l'hydrolyse d'acides humiques (WHITEHEAD *et al.*, 1975). La teneur élevée en matière organique de l'humus forestier (C/N de 28 selon GARAY, 1980) peut expliquer les résultats divergents constatés en sol minéral (CUTLER, 1923 ; HABTE et ALEXANDER, 1975 ; HABTE et ALEXANDER, 1978 ; FREY *et al.*, 1985).

Dans l'humus irradié, AL 83 s'avère plus sensible aux altérations du milieu que les bactéries totales, ce qui confirme les résultats de PETERSON (1962 b). L'inhibition temporaire de la croissance bactérienne dans l'expérience A et de *C. aspera* dans l'expérience B pourrait résulter de péroxydes formés par l'irradiation des molécules d'eau, responsables de la solubilisation de la matière organique d'après SALONIUS *et al.* (1967). Toutefois, cet effet toxique n'est pas toujours constaté, notamment en sol minéral (SALONIUS *et al.*, 1967 ; DARBYSHIRE, 1976).

En conclusion, pour un humus forestier, la fumigation à l'oxyde de propylène se révèle plus adéquate que l'autoclavage ou l'irradiation par les rayons gamma pour l'étude des interactions bactéries - protozoaires.

B) Influence de la densité bactérienne sur la croissance de *C. aspera*.

Dans l'humus fumigé et inoculé avec AL 83, le nombre de kystes est supérieur à l'inoculum dès le troisième jour et témoigne d'une activité des

trophozoïtes. Celle-ci n'est cependant pas suffisante pour réguler les populations de bactéries stimulées par une source carbonée facilement assimilable. L'effet de la prédation n'est donc pas apparent, la quantité de germes ingérés ne représente qu'une faible proportion de la biomasse bactérienne totale. Dans l'humus autoclavé, la présence d'un nombre de kystes supérieur à l'inoculum dans un microcosme le jour 3 montre que, pour des densités de bactéries AL 83 inférieures à 10^5 g^{-1} s.s., une certaine activité des trophozoïtes est possible. Celle-ci, bien que réduite, agit dans le même sens que la toxicité de l'humus. A la faveur d'une dissipation de cette toxicité, les populations bactériennes croissent et induisent une activité accrue des ciliés. Dans l'humus irradié, bien que les cinétiques de croissance des populations de bactéries et de trophozoïtes soient semblables à celles décrites dans l'humus autoclavé, l'effet toxique atteint plus fortement les protozoaires dont l'enkystement est faible au troisième jour.

Le déséquilibre entre la densité des proies et celle des prédateurs, tel qu'il apparaît quand les populations de bactéries atteignent 10^9 g^{-1} s.s., peut induire un effet inhibiteur sur les ciliés. Cet effet inhibiteur pourrait être attribuable à un éventuel effet toxique des produits du métabolisme bactérien en excès dans le milieu (Danso et Alexander, 1975), à un déséquilibre du partage de l'oxygène (Taylor et Strickland, 1938) ou encore à une digestion incomplète (Dive, 1975) due à un transit trop rapide qui diminuerait le taux de reproduction des ciliés. Les densités de germes favorables à une croissance optimale des populations de ciliés semblent se situer, dans les conditions d'expérience, entre 10^6 et 10^8 g^{-1} s.s.

Cette expérience n'illustre donc pas le modèle de Lotka-Volterra. Les densités élevées de bactéries y masquent la plupart du temps l'effet de la prédation, aucun cycle de régulation ne peut apparaître.

Dans l'humus inoculé avec la microflore totale, les relations proie-prédateur sont beaucoup plus difficiles à interpréter car nous ne possédons que des données quantitatives globales qui ne tiennent pas compte de la grande diversité de germes. L'activité temporaire des ciliés pourrait être attribuée, comme pour AL 83, à un effet inhibiteur des densités de bactéries. Mais elle peut également résulter d'antagonismes dus à une prédominance de germes toxiques (Gräf, 1958) ou peu comestibles (Dive, 1973). C'est d'ailleurs une explication plausible à l'inhibition de *C. aspera* dans l'humus autoclavé où cependant le nombre élevé de kystes en fin d'expérience montre que la population de ciliés a tiré de ses ressources trophiques l'énergie suffisante pour constituer un stock de formes de résistances.

En conclusion, si le choix de la stérilisation à l'oxyde de propylène s'impose, en conditions monoxéniques, la relation entre la densité de la proie et celle du prédateur détermine le choix de la taille de l'inoculum pour la mise en place d'un système équilibré. En effet, en inoculant simultanément aux ciliés une faible concentration de bactéries, on crée un système où la croissance des populations de germes, stimulée par l'enrichissement carboné dû à la stérilisation, atteindra rapidement le seuil minimal permettant le développement des ciliés. Dans le genre *Colpoda*, la population quadruple à chaque génération (Singh, 1941 b). La pression de prédation s'installe donc rapidement et la régulation des populations bactériennes sera effective avant que sa production de métabolites n'influence l'activité du prédateur. Cepen-

dant, il est prévisible que dans un modèle expérimental fermé le système ne renouvelle pas le module de régulation cyclique à cause d'une part de son épuisement en carbone et d'autre part du fait que *C. aspera*, stratège r, opportuniste et pionnier, présente un maximum d'activité dans les premiers jours d'incubation pendant lesquels l'enkystement est intense. Des expériences préliminaires ont montré qu'au bout d'une semaine, la population kystique est proportionnelle à l'activité qui l'a suscitée, tandis que les trophozoïtes prédateurs disparaissent. Le milieu dispose donc d'un potentiel de protozoaires important susceptible d'être réactivé à condition que de nouvelles conditions favorables lui soient offertes.

Résumé

L'aptitude à la croissance de *C. aspera* (Protozoaire Cilié) a été testée dans un sol humique préalablement stérilisé à l'oxyde de propylène, à l'autoclave et aux rayons gamma. Deux expérimentations ont été menées, modulant le couple prédateur-proie : *C. aspera* + une bactérie ammonifiante AL 83, *C. aspera* + microflore totale.

Dans l'humus fumigé à l'oxyde de propylène, la croissance bactérienne, stimulée par des résidus carbonés issus de la stérilisation, a induit une activité précoce de *C. aspera*. Dans l'humus autoclavé, la croissance bactérienne, inhibée vraisemblablement par des substances néoformées, a entraîné une croissance plus tardive des populations de ciliés. Dans l'humus irradié, AL 83 a été plus sensible que la microflore totale à des effets inhibiteurs temporaires induits par la stérilisation et les populations de ciliés se sont développées également tardivement.

Ces expériences montrent que la stérilisation à l'oxyde de propylène est la plus adéquate pour l'étude des cinétiques de ciliés bactériophages dans ce type de sol. Elles suscitent également des hypothèses sur l'effet de la densité de la proie sur celle du prédateur.

Summary

Ability of *Colpoda aspera* (Protozoa Ciliophora) to grow in humus previously fumigated by propylene oxide, autoclaved and gamma-irradiated for sterilization.

The growth of *Colpoda aspera* (Protozoa Ciliophora) in humus previously fumigated by propylene oxide, autoclaved and gamma-irradiated has been studied. Two experiments were conducted with two prey-predator patterns: *C. aspera* feeding on pure ammonifiant bacteria (AL 83) and *C. aspera* feeding on total soil bacteria.

In fumigated humus, bacteria growth stimulated by carbon coming from sterilization induced a fast increase of *C. aspera*'s density.

In autoclaved humus, the growth of bacteria was temporarly inhibited probably by new products liberated by heat and the increase of ciliates appeared later.

In irradiated humus, AL 83 was more sensitive then total bacteria to temporarly inhibition effects induced by irradiation. The ciliates growth appeared also tardily.

These experiments show that sterilization by propylene oxide is the most appropriate for studying kinetic of bacteriophagous ciliates in organic soil. It raise up hypothesis about effects of prey densities.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les personnes qui nous ont aidé à l'élaboration de ce travail, en l'occurrence G. FAURIE (Laboratoire de Biologie des Sols, Lyon I) qui a cédé la souche bactérienne AL 83, F. DELAY (Station de Recherches sur la faune du sol, I.N.R.A., Dijon) pour son aide technique et C. MASSON (Laboratoire d'Écologie Générale, Brunoy) pour les figures.

BIBLIOGRAPHIE

ALABOUVETTE (C.), COÛTEAUX (M. M.), OLD (K. M.), PUSSARD (M.), REISINGER (O.) & TOUTAIN (F.), 1981. — Les protozoaires du sol : aspects écologiques et méthodologiques. *Ann. Biol.*, **20**: 256-303.

ALDRICH (D. G.) & MARTIN (J. P.), 1952. — Effect of fumigation on some chemical properties of soils. *Soil Sci.*, **73**: 149-159.

ANDERSON (R. V.), ELLIOTT (E. T.), MC CLELLAN (J. F.), COLEMAN (D. C.), COLE (C. V.) & HUNT (H. W.), 1978. — Trophic Interactions in Soils as They Affect Energy and Nutrient Dynamics. III. Biotic Interactions of Bacteria, Amoebae and Nematodes. *Microbiol Ecol.*, **4**: 361-371.

BOWEN (H. J. M.) & CAWSE (P. A.), 1964 a. — Effects of ionizing radiation on soils and subsequent crop growth. *Soil Sci.*, **97**: 252-259.

BOWEN (H. J. M.) & CAWSE (P. A.), 1964 b. — Some effects of gamma radiation on the composition of the soil solution and soil organic matter. *Soil Sci.*, **98**: 358-361.

BUITKAMP (V.), 1979. — Vergleichende Untersuchungen zur temperatur adaptation von Böden Ciliaten aus klimatisch verschieden Regionen. *Pedobiologia*, **19**: 221-223.

CLARK (F. E.), 1950. — Changes induced in soil by ethylene oxide sterilization. *Soil Sci.*, **70**: 345-349.

COLEMAN (D. C.) & MACFADYEN (A.), 1966. — The recolonization of gamma-irradiated soil by small arthropods. *Oikos*, **17**: 62-70.

COÛTEAUX (M. M.), 1984. — Utilisation des microcosmes pour l'analyse des fonctions écologiques des protozoaires de l'humus. *Acta Oecol. Oecol. Gener.*, **5**: 71-76.

COÛTEAUX (M. M.), 1985 a. — Relation entre la densité apparente d'un humus et l'aptitude à la croissance de ses Ciliés. *Pedobiologia*, **28**: 289-303.

COÛTEAUX (M. M.), 1985 b. — The effects of compressing forest litter (H layer) on the populations of testate amoebae. *Rev. Écol. Biol. Sol*, **22**: 447-461.

CUTLER (D. W.), 1923. — The action of protozoa on bacteria when inoculated in soil. *Ann. Appl. Biol.*, **10**: 137-141.

DANSO (S. K.) & ALEXANDER (M.), 1975. — Regulation of predation by prey density: the protozoan - Rhizobium relationship. *Appl. Microbiol.*, **29**: 515-521.

DARBYSHIRE (J. F.), 1972. — Nitrogen fixation by *Azotobacter chroococcum* in the presence of *Colpoda steini*. I. The influence of temperature. *Soil Biol. Biochem.*, **4**: 359-369.

DARBYSHIRE (J. F.), 1976. — Effect of water suctions on the growth in soil of the ciliate *Colpoda steini* and the bacterium *Azotobacter chroococcum*. *J. Soil Science.*, **27**: 369-376.

DIVE (D.), 1973. — Nutrition holozoïque de *Colpidium campylum*. Phénomènes de sélection et d'antagonisme avec les bactéries. *Water Research,* **7**: 695-706.

DIVE (D.), 1975. — Influence de la Concentration Bactérienne sur la Croissance de *Colpidium campylum. J. Protozool.,* **22**: 545-550.

ENO (C. F.) & POPENOE (H.), 1964. — Gamma-radiation compared with steam and methyl bromide as a sterilizing agent. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.,* **28**: 533-535.

FISHER (A.) & YATES (F.), 1943. — *Statistical tables for biological, agricultural and medical research.* OLIVIER & BOYD Ed., Edimburg. Tables VIII, **2**: 8-10, 66.

FOISSNER (W.), 1980. — Colpodide Ciliaten (Protozoa : Ciliophora) aus alpinen Böden. *Zool. Jb. Syst.,* **107**: 391-432.

FREY (J. S.), MC CLELLAN (J. F.), INGHAM (E. R.) & COLEMAN (D. C.), 1985. — Filter - out - grazers (FOG): A filtration experiment for separating protozoan grazers in soil. *Biol. Fert. Soils,* **1**: 73-79.

GARAY (I.), 1980. — Étude d'un écosystème forestier mixte. *Rev. Écol. Biol. Sol,* **17**: 525-541.

GRÄF (W. von), 1958. — Uber Gewinnung und Beschaffenheit Protostatisch-protocider Stoffe aus Kulturen von *Pseudomonas fluorescens. Arch. Hyg. Bakt.,* **142**: 267-275.

HABTE (M.) & ALEXANDER (M.), 1975. — Protozoan as Agents Responsible for the Decline of *Xanthomonas campestris* in Soil. *Appl. Microbiol.,* **29**: 159-164.

HABTE (M.) & ALEXANDER (M.), 1978. — Mechanisms of persistence of low numbers of bacteria preyed upon by protozoa. *Soil Biol. Biochem.,* **10**: 1-6.

HOWARD (P. J. A.) & FRANKLAND (J. C.), 1974. — Effects of certain full and partial sterilization treatments on leaf litter. *Soil Biol. Biochem.,* **6**: 117-123.

KHAFIF (T.), GOETZ (N.), COSTE (C. M.) & BASTIDE (J.), 1983. — Stérilisation thermique des sols et dégradation des herbicides. *Soil Biol. Biochem.,* **15**: 205-209.

KATZNELSON (H.), 1940. — Survival of organisms inoculated into sterilized soil. *Soil Sci.,* **49**: 211-217.

LUFTENEGGER (G.), FOISSNER (W.) & ADAM (H.), 1985. — r- and K-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. *Oecol.,* **66**: 574-579.

MCLAREN (A. D.), RESHETKO (L.) & HUBER (W.), 1957. — Sterilization on soil by irradiation with an electron beam, and some observations on soil enzyme activity. *Soil Sci.,* **83**: 497-502.

MARTIN (J. P.) & ALDRICH (D. G.), 1952. — Effect of Fumigation on Soil Aggregation. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.,* **16**: 201-203.

PETERSON (G. H.), 1962 a. — Respiration of soil sterilized by ionizing radiations. *Soil Sci.,* **94**: 71-74.

PETERSON (G. H.), 1962 b. — Microbial activity in heat and electron sterilized soil seeded with microorganisms. *Canad. J. Microb.,* **8**: 519-524.

POCHON (J.) & TARDIEUX (P.), 1962. — *In: Techniques d'analyses en Microbiologie du Sol.* DE LA TOURNELLE Ed., St-Mandé, 110 p.

POWLSON (D. S.) & JENKINSON (D. S.), 1976. — The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. II. Gamma irradiation, autoclaving, air-drying and fumigation. *Soil Biol. Biochem.,* **8**: 179-188.

RAMSAY (A. J.) & BAWDEN (A. D.), 1983. — Effects of sterilization and storage on respiration, nitrogen status and directs counts of soil bacteria using acridine orange. *Soil Biol. Biochem.,* **15**: 263-268.

ROBERGE (M. R.), 1971. — Respiration of a black spruce humus sterilized by heat or irradiation. *Soil Sci.,* **111**: 124-128.

SALONIUS (P. O.), ROBINSON (J. B.) & CHASE (F. E.), 1967. — A comparison of autoclaved and gamma-irradiated soils as media for microbiol colonization experiments. *Plant and Soil*, **27**: 239-248.

SCHWARTZ (R.), 1981. — *Influence de la monoculture de résineux sur la microflore des sols et la décomposition des litières.* Thèse 3e cycle, Nancy I.

SINGH (B. N.), 1941 b. — The influence of different bacterial food supplies on the rate of reproduction in *Colpoda steinii* and the factors influencing encystation. *Ann. Appl. Biol.*, **28**: 65-73.

SKIPPER (H. D.) & WESTERMANN (D. T.), 1973. — Comparative effects of propylene oxide, sodium azide and autoclaving on selected soil properties. *Soil Biol. Biochem.*, **5**: 409-414.

STOTZKY (G.) & MORTENSEN (J. L.), 1959. — Effect of Gamma Radiation on Growth and Metabolism of Microorganisms in an Organic Soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, **23**: 125-127.

STOUT (J. D.), 1955 a. — The Effect of Partial Steam Sterilization on the Protozoan Fauna of a Greenhouse Soil. *J. Gen. Microbiol.*, **12**: 237-240.

TAYLOR (C. V.) & STRICKLAND (A. G. R.), 1938. — Reactions of *Colpoda duodenaria* to the environmental factors. Arch. *Protistenk.*, **90**: 396-409.

TAYLOR (W. D.), 1978. — Growth Responses of Ciliates Protozoa to the Abundance of their Bacterial Prey. *Microb. Ecol.*, **4**: 207-214.

TU (C. M.), 1982. — Physical treatment and reinoculation of soil: effects on micro-organisms and enzyme activities. *Soil Biol. Biochem.*, **14**: 57-61.

VAN BAVEL (C. H. M.), 1950. — Soil aggregate stability as affected by sterilization with ethylene oxide and heat. *Plant and Soil*, **2**: 395-404.

WHITEHEAD (D. C.), BUCHAN (H.) & HARTLEY (R. D.), 1975. — Components of soil organic matter under grass and arable cropping. *Soil Biol. Biochem.*, **7**: 65-71.

WOODS (L. E.), COLE (C. V.), ELLIOTT (E. T.), ANDERSON (R. V.) & COLEMAN (D. C.), 1982. — Nitrogen transformation in soil as affected by bacterial - microfaunal interactions. *Soil Biol. Biochem.*, **14**: 93-98.